

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
імені В. Н. КАРАЗІНА**

**ЧУМАКОВА ВІКТОРІЯ ВОЛОДИМИРІВНА**

**УДК 581.165:582.546.11]:631.53.027.32(043.3)**

**ФІТОГОРМОНАЛЬНА ТА ТРОФІЧНА РЕГУЛЯЦІЯ ЯРОВИЗАЦІЙНОГО  
ПРОЦЕСУ ОЗИМОЇ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ *IN VIVO* ТА *IN VITRO***

**03.00.12 – фізіологія рослин**

**Автореферат**

**дисертації на здобуття наукового  
ступеня кандидата біологічних наук**

**Харків – 2021**

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Харківському національному університеті імені В. Н. Каразіна Міністерства освіти і науки України

**Науковий керівник:** кандидат біологічних наук, доцент  
**Авксентьєва Ольга Олександрівна,**  
Харківський національний університет  
імені В. Н. Каразіна,  
доцент кафедри фізіології і біохімії  
рослин та мікроорганізмів.

**Офіційні опоненти:** доктор біологічних наук, професор  
**Косаківська Ірина Василівна,**  
Інститут ботаніки імені М. Г. Холодного  
Національної академії наук України,  
завідувач відділу фітогормонології;

доктор біологічних наук, професор  
**Дробик Надія Михайлівна,**  
Тернопільський державний педагогічний  
інститут імені Володимира Гнатюка,  
декан хіміко-біологічного факультету,  
професор кафедри загальної біології та методики  
навчання природничих дисциплін.

Захист відбудеться «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2021 р. о \_\_\_\_ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради К 64.051.32 Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна за адресою: 61022, м. Харків, майдан Свободи, 4, ауд. 3-18.

З дисертацією можна ознайомитись у Центральній науковій бібліотеці Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна за адресою: 61022, м. Харків, майдан Свободи, 4.

Автореферат розісланий «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2021 р.

Учений секретар  
спеціалізованої вченої ради

Ольга УТЕВСЬКА

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Обґрунтування вибору теми дослідження.** Дослідження систем регуляції росту та розвитку рослин є актуальним завданням сучасної фітофізіології (Авксентьева, Жмурко, 2011). Пшениця м'яка – одна з найцінніших продовольчих культур у світі, продуктивність якої залежить від реалізації генетично закладених властивостей, а також впливу умов навколишнього середовища, що діють на кожному етапі онтогенезу (Моргун, 2010; Gol, 2017). Одним із найважливіших етапів розвитку рослин озимої пшениці є процес яровизації, для нормального проходження якого необхідний комплекс взаємодіючих екзо- та ендогенних факторів. Вагомим фактором регуляції перебігу яровизаційного процесу є генетичний контроль, який у пшениці м'якої здійснюється системою генів *Vrn*, що контролює потребу в яровизації та визначає тип розвитку рослин (ярий або озимий) та опосередковано її продуктивність (Стельмах, 2000; Henderson, 2003; Dennis, Peacock, 2009). За сучасності достатньо інтенсивно досліджуються молекулярно-генетичні механізми експресії генів *Vrn* за яровизації (Щербань, Салина, 2013; Zhanget al, 2015; Muterko at al, 2015).

Фітогормональний статус вагомий в регуляції флорального морфогенезу рослин, а також яровизації. Серед відомих фітогормонів саме гібереліни (ГК) можуть частково замінити дію яровизації, сприяючи цвітінню деяких рослин (Pearce, 2013). ГК взаємопов'язані з вуглеводами на рівні регуляції трансдукції гормональних та цукрових сигналів за дії стресових факторів (Rosa, 2009; Firuzeh et al, 2015) та їх метаболічної активності (Silva Vieira et al., 2013).

Вуглеводи як основні фактори трофічної регуляції виконують в рослинному організмі також роль сигнальних молекул – універсальних регуляторів експресії генів детермінації процесів росту і розвитку (Koch, 2004; Eveland, Jackson, 2011).

За сучасності використання методів культури *in vitro* стає одним з найпоширеніших інструментів досліджень у фізіології рослин. Вони широко застосовуються у вивченні морфогенезу пшениці м'якої *Triticum aestivum* L. для одержання нових і вдосконалення існуючих сортів цієї культури (Дубровна та ін., 2014).

Нині достатньо глибоко вивчені молекулярні механізми експресії генів *Vrn*, роль окремих фітогормонів за яровизації, а також роль вуглеводів як вагомих трофічних та сигнальних чинників у експресії генів. Однак все ще недостатньо з'ясована роль взаємозв'язку трофічних, генетичних та фітогормональних факторів у регуляції перебігу яровизаційних процесів, а відтак і регуляції темпів розвитку пшениці озимої м'якої. Дослідження у цьому напрямку актуальні для поглиблення існуючих уявлень про механізми регуляції розвитку пшениці м'якої.

Вивчення ефектів генів *Vrn* на морфогенетичні процеси у культурі *in vitro* пшениці м'якої практично не проводилося. Однак воно необхідне для поглиблення розуміння біологічної природи стабільності генетичних систем за порушення цілісності рослинного організму і, зокрема, системи генів *Vrn* пшениці озимої у культурі *in vitro*. У цьому аспекті вагомим є також вивчення ефектів ГК на морфогенез у культурі *in vitro*, як одного з чинників його регуляції.

Викладене обумовлювало актуальність проведення наших досліджень.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота виконувалася у рамках держбюджетної теми НДР кафедри фізіології і біохімії рослин та мікроорганізмів ХНУ імені В. Н. Каразіна «Дослідження молекулярно-генетичних та фізіолого-біохімічних механізмів яровизаційного та фотоперіодичного контролю онтогенезу рослин *in vivo* та *in vitro*» № держреєстрації 0118U 002104 та тем НДР за грантом Фонду розвитку і модернізації наукового та навчально-наукового обладнання Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна «Модернізувати і розробити комплекс науково-навчального обладнання для програмованого культивування та ідентифікації молекулярних маркерів особливостей росту і розвитку рослин та мікроорганізмів» шифр 811Н/9-15, «Розробити комплекс науково-навчального обладнання для дослідження фоторецепторних систем регуляції росту і розвитку рослин» шифр 811Н/10-16, «Розробити комплекс навчально-наукового обладнання для дослідження ефектів екзогенних індукторів спрямованості шляхів морфогенезу *in vitro* *Triticum aestivum* L. та *Glycine max* (L.) Merr.» шифр 811Н/12-18.

**Мета і завдання дослідження.** Мета досліджень – з'ясувати закономірності фітогормональної та трофічної регуляції яровизаційного процесу озимої м'якої пшениці *Triticum aestivum* L. за умов *in vivo* та *in vitro*.

Для досягнення даної мети були поставлені такі **завдання**:

- 1) проаналізувати молекулярно-біологічний контроль яровизаційного процесу за алельним станом генів системи *Vrn* в умовах *in vivo* та *in vitro*;
- 2) дослідити дію контрастних трофічних умов яровизації на мітотичну активність коревих меристем, динаміку ростової реакції та вмісту розчинних вуглеводів в проростках озимої пшениці;
- 3) визначити вплив праймування гібереліном на накопичення біомаси, вміст та фракційний склад водорозчинних цукрів в яровизованих проростках озимої пшениці;
- 4) встановити закономірності пролонгованого впливу контрастних умов трофічного забезпечення та дії гіберелінів за яровизації на темпи розвитку рослин озимої пшениці;
- 5) вивчити вплив тривалості періоду яровизації та зміни фітогормонального складу живильного середовища на морфогенетичні реакції калусної культури сортів озимої пшениці.

**Об'єкт дослідження:** закономірності фітогормональної, трофічної та генетичної регуляції яровизаційного процесу *Triticum aestivum* L.

**Предмет дослідження** - перебіг фізіолого-біохімічних, цитогенетичних, морфологічних та морфогенетичних процесів і темпів розвитку озимої пшениці під контролем генів *Vrn* за умов *in vivo* та *in vitro*.

**Методи досліджень:** молекулярно-біологічні – для визначення алельного стану генів *Vrn*, фізіолого-біохімічні – для визначення вмісту розчинних вуглеводів, цитогенетичні і мікроскопічні – для визначення проліферативної активності меристем, вегетаційні досліді, фенологічні спостереження і морфофізіологічні методи – для визначення характеру ростових процесів та темпів розвитку,

біотехнологічні – для досліджень в культурі *in vitro*, статистичні – для визначення достовірності одержаних результатів.

**Наукова новизна отриманих результатів.** Вперше показана залежність алельного стану генів *Vrn* від трофічних умов та тривалості яровизаційного процесу. Встановлено стимулюючу дію екзогенної сахарози на мітотичну активність кореневих меристем за яровизаційного впливу. Виявлено вплив контрастних трофічних умов яровизації та праймування гіберелінами на пролонговані ефекти регуляції темпів розвитку рослин пшениці озимої.

Вперше проведений аналіз алельного стану генів *Vrn* у калусній культурі пшениці озимої. Сформульоване положення щодо стабільності системи генів *Vrn* за умов культивування *in vitro*. Встановлено, що за яровизації у калусній культурі озимої пшениці відбуваються інтенсивні морфогенетичні реакції, що значно стимулює процес отримання рослин-регенерантів. Вперше показана можливість оптимізувати фітогормональний склад живильного регенераційного середовища для культивування пшениці м'якої в культурі *in vitro* шляхом додаванням фітогормону ГК<sub>3</sub>.

**Практичне значення отриманих результатів.** Результати дослідження можуть бути використані для обґрунтування нових методів регуляції темпів розвитку рослин озимої пшениці. Встановлена стимуляція морфогенетичних процесів в культурі *in vitro* за дії яровизації та оптимізація фітогормонального складу живильного середовища можуть використовуватися у біотехнологічних дослідженнях пшениці м'якої *Triticum aestivum* L.

Результати роботи використовуються при викладанні нормативного курсу «Фізіологія і біохімія рослин» та спеціальних курсів «Системність регуляції онтогенезу рослин», «Прикладна біохімія та біотехнологія рослин» та «Методи культури *in vitro* вищих рослин» на кафедрі фізіології та біохімії рослин і мікроорганізмів ХНУ імені В. Н. Каразіна, також вони слугували основою курсових, кваліфікаційних робіт бакалаврів та магістрів.

**Публікації.** За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 28 наукових праць, серед яких 6 статей у фахових виданнях України (у т.ч. 1 стаття у виданні, що входить до наукометричної бази Web of Science), 1 стаття у закордонному виданні, 2 статті, які додатково відображають наукові результати дисертації, 19 публікацій апробаційного характеру.

**Особистий внесок здобувача.** Дисертант самостійно опрацював наукову літературу за темою дисертації, за участі наукового керівника обґрунтував мету і задачі досліджень, спланував і провів експерименти, оволодів необхідними методами, провів статистичну обробку результатів дослідів. За участі наукового керівника проаналізував отримані результати та підготував наукові публікації.

**Апробація результатів.** Апробація матеріалів дисертації була проведена на дванадцяти наукових конференціях:

- XI Міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів (Львів, 20-23 квітня 2015 р.);
- VII Всеукраїнській науково-практичній конференції «Біологічні дослідження - 2016» для молодих учених і студентів (10-11 березня 2016 р., Житомир);

- X і XI Міжнародних конференціях молодих учених «Біологія: від молекули до біосфери» (Харків, 2-4 грудня 2015 р., 29 листопада - 2 грудня, 2016 р.);
- III Міжнародній науковій конференції «Регуляція росту і розвитку рослин: фізіолого-біохімічні і генетичні аспекти» (Харків, 11-12 листопада, 2014 р.);
- II науково-методичному інтернет-семінарі «Фізіологія рослин у системі сучасних біологічних знань та наук» (Харків, 14 грудня 2016 р.);
- VI Міжнародній науково-практичній конференції «Біотехнологія: звершення та надії» (Київ, 14-16 листопада 2017 р.);
- Міжнародній науково-практичній конференції «Modern methodologies, innovations, and operational experience in the field of biological sciences» (Люблін, Польща, 27–28 грудня, 2017 р.);
- Міжнародній науково-практичній конференції «Клеточная биология и биотехнология растений» (Мінськ, Республіка Білорусь, 28-31 травня 2018 р.);
- IV і V Міжнародній науковій конференції «Сучасна біологія рослин: теоретичні та прикладні аспекти» (Харків, 9-10 жовтня 2018 р., 12-13 лютого 2020 р.);
- 44-й Щорічній конференції молодих вчених Холод в біології та медицині: «Актуальні питання кріобіології, трансплантології та біотехнології» (Харків, 19 травня 2020 р.).

**Об'єм і структура дисертації.** Дисертаційна робота викладена на 184 сторінках друкованого тексту, складається зі вступу, 6 розділів, узагальнення, загальних висновків, списку використаних джерел та 5 додатків. Робота ілюстрована 19 таблицями та 42 рисунками. Список використаних джерел містить 217 найменувань, з них 78 кирилицею та 139 латиницею.

## **ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ**

### **Огляд наукової літератури**

У огляді наукової літератури проаналізовані дані стосовно фізіологічної природи, фітогормонального, генетичного та епігенетичного контролю яровизації у рослин озимої м'якої пшениці, а також дані про роль трофічних факторів у яровизації. Проаналізовані дані щодо культури *in vitro* як можливої модельної системи дослідження морфогенезу у калусній культурі за яровизації. На підставі аналізу визначені недостатньо досліджені вагомні аспекти фізіолого-біохімічних механізмів яровизаційного процесу і обґрунтовані мета і задачі досліджень.

### **Матеріали, умови і методи проведення досліджень**

Рослинний матеріал. У дослідах використані сорти озимої м'якої пшениці: Статна, Дорідна, Альянс, Астет, Миронівська 808 і Ольвія та моногеннодомінантні ізогенні за генами *Vrn* ліній (NILs) ярого типу розвитку, створені у генофоні озимих сортів Миронівська 808 і Ольвія. Залежно від задач дослідження використовували насіння, проростки та калусні культури.

Методичний підхід. В основу досліджень покладена наступна робоча гіпотеза. Зміна рівня трофічного забезпечення проростків за яровизації і праймування ГК на його фоні вплине на алельний стан генів *Vrn* (потреби у яровизації) і їх експресію, а також на темпи розвитку рослин пшениці озимої, вирощених з проростків, яровизованих за таких умов. Тому у дослідженні була використана наступна модель: яровизація проростків з ендоспермом (оптимальне трофічне забезпечення), яровизація проростків з ендоспермом на 3 %-ній сахарозі (надлишкове трофічне забезпечення), яровизація зародків на 3 %-му розчині сахарозі (штучне трофічне забезпечення), яровизація ізольованих зародків на воді (відсутність трофічного забезпечення). На фоні різного трофічного забезпечення застосовували праймування проростків ГК за яровизації.

У культурі *in vitro* вивчали стабільність системи генів *Vrn* з використанням ізогенних за цими генами ліній пшениці, порівнюючи алельний стан генів у культурі зі станом їх *in vivo* (у зернівках), виходячи з того, що порушення цілісності рослинного організму вплине на стабільність генетичної системи.

Умови і методи дослідження. Яровизацію здійснювали при  $+4 \pm 1$  °C протягом 45-ти діб, проби для молекулярно-біологічних, цитологічних, морфофізіологічних та біохімічних аналізів відбирали у динаміці – через 15, 30 і 45 діб після початку яровизації.

Темпи розвитку рослин залежно від трофічного забезпечення та фітогормонального контролю яровизації вивчали у вегетаційних дослідах. Використали рослини, вирощені з проростків, які яровизували за різного трофічного забезпечення та праймування ГК. Рослини вирощували у факторостатній камері кафедри фізіології і біохімії рослин та мікроорганізмів ХНУ імені В. Н. Каразіна у ґрунтовій культурі при 22 / 18 °C (день / ніч) і 16-годинному фотоперіоді. Визначали тривалість фаз онтогенезу і періоду від висаджування до колосіння і дозрівання.

Ефекти яровизації на калусо- і морфогенез вивчали у дослідах з пересадковою калусною культурою. Пробі для аналізів відбирали у динаміці – через 15, 30 і 45 діб після початку дії пониженої ( $+4 \pm 1$  °C) температури. Регенераційне живильне середовище (РС) для культивування: МС + 3 мг/г БАП і 0,5 мг/г НОК.

Ефекти ГК у складі живильного середовища на морфогенез вивчали за схемою: 1) РС (МС + 3 мг/г БАП і 0,5 мг/г НОК – контроль); 2) РС + 0,1 мг/л ГК; 3) РС + 0,5 мг/л ГК; 4) РС + 10 мг/л ГК. Інкубація при 26 °C, на світлі з інтенсивністю 2-3 кЛк, фотоперіод 16 годин, тривалість  $28 \pm 2$  дні. Прояв морфогенетичних реакцій у культурі оцінювали за інтенсивністю процесів ризогенезу, хлорофілогенезу та гемогенезу (%).

Молекулярно-біологічні, біохімічні, морфофізіологічні і цитологічні аналізи. Алельний стан генів *VRN* визначали у насінні, яровизованих проростках за різного трофічного забезпечення та *in vitro* у пересадковій культурі. ДНК виділяли за допомогою 2 методик: 1) для зернівок – набір «DiatomPrep 100» (Ізоген, Росія); 2) для яровизованих проростків і пересадкової калусної культури (DNA Extraction..., 2003) зі СТАВ-буфером за стандартною методикою. За ПЛР використані алель специфічні праймери (MassWheat, EVEX та NCBI). Розподіл продуктів ампліфікації

здійснювали шляхом електрофорезу в 1,5 % агарозному гелі в присутності бромистого етидію (10 мг/мл). Довжину ампліфікованих фрагментів ДНК визначали за допомогою молекулярного маркера 100 bp + 1,5 kb. Спектри фрагментів ДНК реєстрували в ультрафіолеті (312 нм) за допомогою транслюмінатора та цифрової фотокамери Nikon, їх обробляли за програмою TotalLab (TL120.v2009).

Морфологічні аналізи. Визначали динаміку лінійного росту надземної і підземної частини проростків (см) та накопичення біомаси (мг) протягом яровизації за різного рівня трофічного забезпечення.

Мітотичний індекс (МІ, %) у меристемах корінців 45-добових яровизованих проростків визначали на тимчасових давлених препаратах за (Паушева, 1988) з використанням мікроскопу ЛОМО МІКМЕД-1 (за збільшення  $\times 400$ ). Враховували клітини, які знаходилися на ана-, мета- і телофазі мітозу.

Вміст розчинних вуглеводів (мг/г сухої маси) у проростках протягом яровизації визначали мікрометодом Швецова і Лук'яненко (Єрмаков, 1987) після екстрагування 80 %-ним етиловим спиртом.

Проведено по 3-5 дослідів, аналізи виконані у 2-3 аналітичних повторностях. Статистична обробка даних виконана за допомогою програмного забезпечення Microsoft Excel. Істотність різниці по варіантах оцінювали за t-критерієм Стьюдента ( $t_{0,05}$ ), або за найменшою істотною різницею ( $HP_{0,05}$ ) методом однофакторного дисперсійного аналізу. В таблицях і на рисунках наведені середні значення та їх стандартні похибки.

### Результати досліджень та їх обговорення

**Алельний стан локусів генів *VRN* та темпи розвитку пшениці.** Для встановлення зв'язку алельного стану генів *Vrn* з темпами розвитку пшениці досліджували їх алельний стан у ізогенних ліній. Результати показали, що у алельному стані генів *Vrn* у ізоліній *Vrn*-1 та *Vrn*-3 наявні домінантні алелі *Vrn-A1* з продуктом ампліфікації 965 п.н., а також рецесивні алелі *vrn-B1* та *vrn-D1* з продуктами ампліфікації 1149 п.н. та 997 п.н. (рис. 1, а, б, в: 2, 4, 5, 7).

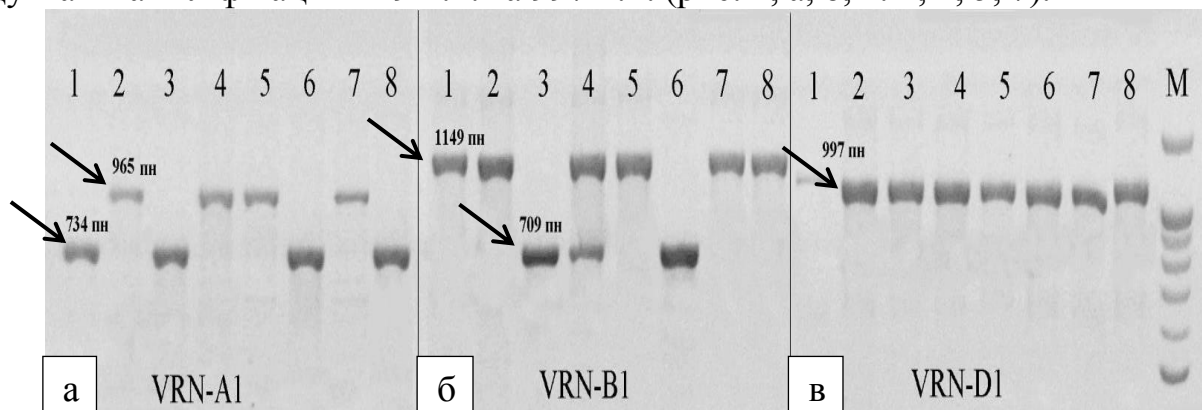


Рис. 1 Стан алелів генів *Vrn* у ізогенних ліній пшениці: Лінії сорту М 808 (1-4): 1 - вихідний сорт; 2 - *Vrn*-1; 3 - *Vrn*-2; 4 - *Vrn*-3. Лінії сорту Ольвія (5-8): 5 - *Vrn*-1; 6 - *Vrn*-2; 7 - *Vrn*-3; 8 - вихідний сорт. М - молекулярний маркер 100 bp + 1,5 kb

У ліній *Vrn*-2, а також вихідних сортів виявлений рецесивний алель *vrn-A1* з продуктом ампліфікації 734 п.н. (рис. 1, а: 1, 3, 6, 8). У ізоліній *Vrn*-2 в генотипі



присутній домінантний алель *Vrn-B1* (709 п.н.) (рис. 1, б: 3, 6). Ізолінії *Vrn-3* не мають домінантного алелю *Vrn-D1* (рис. 1, в: 5, 7). Отже, досліджені лінії різняться за алельним станом генів *Vrn* (Авксентьєва, Шулік, 2015), що співпадає з літературними даними (Лихенко та ін., 2014; Потокина та ін., 2012).

Вірогідно, ці відмінності визначають різні темпи розвитку ліній, бо вони відрізнялися за тривалістю періоду сходи-колосіння. У вегетаційних і польових дослідках лінії *Vrn-2* значно пізніше переходили до колосіння, ніж лінії *Vrn-1* і *Vrn-3* (Авксентьєва, Шулік, 2015), що підтверджує літературні дані (Zhmurko, Avksentyeva, Hang Bin, 2013). Зазначимо, що, незалежно від генотипу, лінії сорту М 808 розвивалися значно повільніше, ніж лінії сорту Ольвія. Вірогідно, це пояснюється впливом генофону сорту, у якому створені лінії.

**Алельний стан генів *Vrn* сортів озимої пшениці за різних трофічних умов яровизації.** Для встановлення можливого впливу рівня трофічного забезпечення яровизації на експресію генів *Vrn* визначали зміни у їх алельному стані за цих умов. Результати показали, що протягом яровизації 15 і 30 діб в контрастних умовах трофічного забезпечення у алельному стані генів *Vrn* у проростках обох сортів змін не відбувалося. Через 45 діб яровизації (рис. 2) гени *Vrn-A1* і *Vrn-D1* обох сортів пшениці М 808 і Ольвія були представлені тільки рецесивними алелями *vrn-A1* і *vrn-D1* (рис. 2 а, в). Однак в алельному стані гена *Vrn-B1* у варіанті зернівки з ендоспермом і ізолювані зародки + 3 % р-н сахарози, було виявлено поряд з рецесивними алелями *vrn-B1* (1149 п.н.), також і домінантні алелі *Vrn-B1* (709 п.н.) (рис. 2 б).

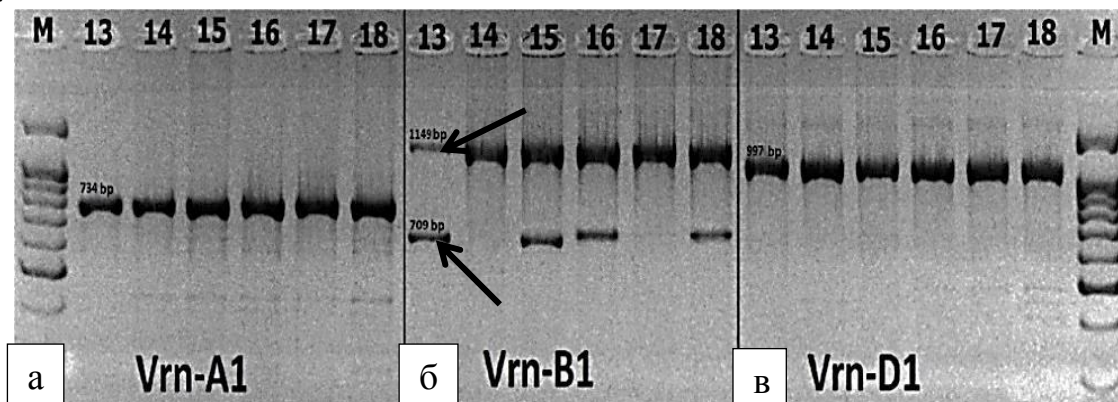


Рис. 2 Алельний стан локусів генів *Vrn-A1*, *Vrn-B1* і *Vrn-D1* 45-добових яровизованих проростків сортів пшениці: М 808 (13 - зернівки з ендоспермом, 14 - ізолювані зародки + вода, 15 - ізолювані зародки + 3 % р-н сахарози); Ольвія (16 - зернівки з ендоспермом, 17 - ізолювані зародки + вода, 18 - ізолювані зародки + 3 % р-н сахарози). М - молекулярний маркер 100 bp +1,5 kb

Отже, умовах природного та штучного трофічного забезпечення тільки в локусі гена *Vrn-B1* – головного репресора цвітіння в генетичній системі яровизаційного контролю відбулися зміни в алельному стані. Це дає підставу для припущення, що експресія генів *Vrn* залежить від трофічного забезпечення процесу яровизації (Авксентьєва, Шулік, 2018).

**Алельний стан локусів генів *Vrn* за умов культури *in vitro*.** Стабільність генетичних систем у культурі *in vitro* є необхідною умовою вивчення їх ефектів на

морфогенетичні процеси у пшениці (Дубровна та інш., 2014). Виходячи з цього ми визначали алельний стан генів *Vrn* в культурі *in vitro*, порівняно до стану *in vivo* (в зернівках). Результати показали, що в культурі *in vitro* ізоляції за інтенсивністю калусогенезу ранжуються наступним чином: *Vrn-2* > сорт > *Vrn-1* > *Vrn-3*. Це може свідчити про участь генів *Vrn* у регуляції морфогенетичних реакцій у культурі *in vitro*. Зіставлення результатів визначення алельного стану генів *Vrn in vivo* (зернівки) та *in vitro* (калусна культура) показало його майже повну ідентичність. Відмінності виявлені тільки у ізоляції *Vrn-3* сорту Миронівська 808 в алельному стані гена *Vrn-B1*: стан у зернівках – *VRN-A1a VRN-B1 vrn-B1 vrn-D1*, а стан у калусній культурі – *VRN-A1a vrn-B1 vrn-D1*. Це може бути пов'язано з геномними перебудовами при індукції калусогенезу. Отже, ці результати вказують на стабільність системи генів *Vrn* в системі *in vitro* (Авксентьєва, Шулік, 2016).

**Вплив контрастних умов трофічного забезпечення за яровизації на мітотичну активність меристем.** Процеси яровизації, як відомо, відбуваються у меристематичних тканинах. Вірогідно, що їх перебіг до певної міри може бути пов'язаний з інтенсивністю проліферації, яка може залежати від трофічного забезпечення яровизаційного процесу. Виходячи з цього, ми дослідили вплив різного рівня трофічного забезпечення яровизації на мітотичний індекс (МІ) проростків кореневих меристем у сортів озимої пшениці – Дорідна та Статна (табл. 1).

Таблиця 1

**Вплив контрастних умов трофічного забезпечення яровизації на мітотичну активність кореневих меристем сортів пшениці озимої м'якої**

Сорт	Варіант	Мітотичний індекс, %
Статна	зернівки + вода (контроль)	7,31
	зернівки + 3 % р-н сахарози (контроль)	6,52
	ізольовані зародки + вода	6,82
	ізольовані зародки + 3 % р-н сахарози	8,45**
Дорідна	зернівки + вода (контроль)	8,01
	зернівки + 3 % р-н сахарози (контроль)	6,51**
	ізольовані зародки + вода	6,86*
	ізольовані зародки + 3 % р-н сахарози	8,92**

Примітка. Різниця з контролем статистично значуща \*  $HP_{0,05} = 1,09\%$ ;  
 \*\*  $HP_{0,05} = 1,45\%$

Результати показали, що МІ у обох сортів на 45-ту добу яровизації найвищим був в умовах природного і штучного трофічного забезпечення процесу яровизації. Надлишок трофічного забезпечення (зернівки + 3 % р-н сахарози), як і його дефіцит (ізольовані зародки + вода), інгібували процес проліферації клітин (Авксентьєва, Шулік, 2017).

Тривалість фаз мітотичного циклу характеризує стан клітинної популяції. За нашими даними у кореневих меристемах проростків після 45-ти діб яровизації більша частина клітин знаходилася в анафазі (до 70 %), незалежно від варіанту досліду. Можливо, це пов'язано з тим, що на 45-ту добу яровизації клітинна

популяція наближається до завершення поділу клітин. У варіантах зернівки + 3 % розчин сахарози у обох сортів кількість клітин у профазі була більшою (на 7-10 %), ніж у інших варіантах досліджу. Це співпадало зі зниженим МІ у цьому варіанті (табл.1), що може свідчити про інгібуючий ефект надлишку трофічного забезпечення на процес проліферації (Авксентьєва, Шулік, 2017).

Отже, одержані результати можуть свідчити, що яровизаційні процеси і, зокрема проліферативні, пов'язані з рівнем трофічного забезпечення їх перебігу.

**Динаміка вмісту водорозчинних вуглеводів в проростках залежно від трофічного забезпечення яровизації.** Відомо, що обмін вуглеводів є неодмінною умовою нормального перебігу процесів життєдіяльності рослин, а також, що вуглеводи виконують функцію сигнальних молекул за експресії генів, пов'язаних з контролем росту і розвитку рослин. Вірогідно, що ці функції вуглеводів властиві і для процесу яровизації. Враховуючи це положення ми вивчали обмін вуглеводів за яровизації на фоні різного рівня трофічного забезпечення.

Результати показали (рис. 3 А, Б), що динаміка вмісту моноцукрів за штучного трофічного забезпечення (ізолювані зародки + сахароза) протягом яровизації була подібною до динаміки за оптимального (зернівки + вода) у обох сортів. За надмірного трофічного забезпечення (зернівки + сахароза) вміст моноцукрів поступово знижувався протягом яровизації у обох сортів (рис. 3 А, Б).

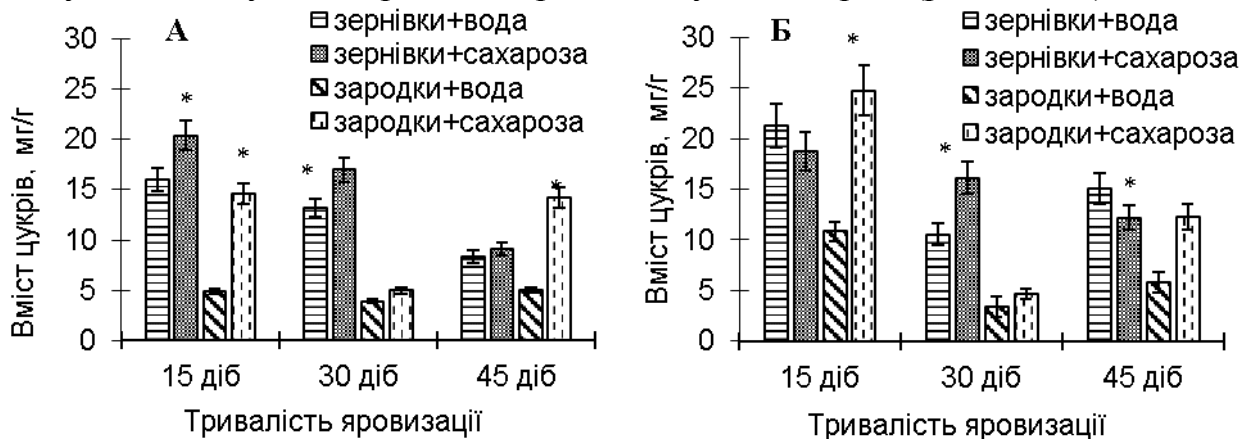


Рис. 3 Динаміка вмісту моноцукрів протягом яровизації в проростках пшениці озимої Дорідна (А) та Статна (Б) за різних умов трофічного забезпечення. Примітка. \* - різниця між варіантами статистично значуща при  $P \leq 0,05$

За відсутності трофічного забезпечення (зародки + вода) динаміка вмісту моноцукрів протягом яровизації у сорту Дорідна (рис. 3 А) практично не змінювалася, а у сорту Статна (рис. 3 Б) за характером була подібною до динаміки за оптимального трофічного забезпечення.

Динаміка вмісту олігоцукрів у обох сортів за оптимального і надмірного трофічного забезпечення характеризувалася зниженням вмісту від 15-ї до 30-ї доби і підвищенням до 45-ї доби яровизації (рис. 4 А, Б). Яровизація у варіанті зародки + сахароза у сорту Дорідна (рис. 4 А) зумовила зростання вмісту олігоцукрів з 15-ї до 30-ї доби яровизації і зниження до 45-ї доби, а у сорту Статна (рис. 4 Б) – поступове зростання вмісту олігоцукрів протягом всього періоду яровизації. За відсутності трофічного забезпечення у сорту Дорідна (рис. 4 А) відбувалося зростання вмісту

олігоцукрів до 30-ї доби яровизації і зниження до 45-ї доби. У сорту Статна за цього варіанту змін у динаміці вмісту олігоцукрів протягом яровизації не відбувалося.

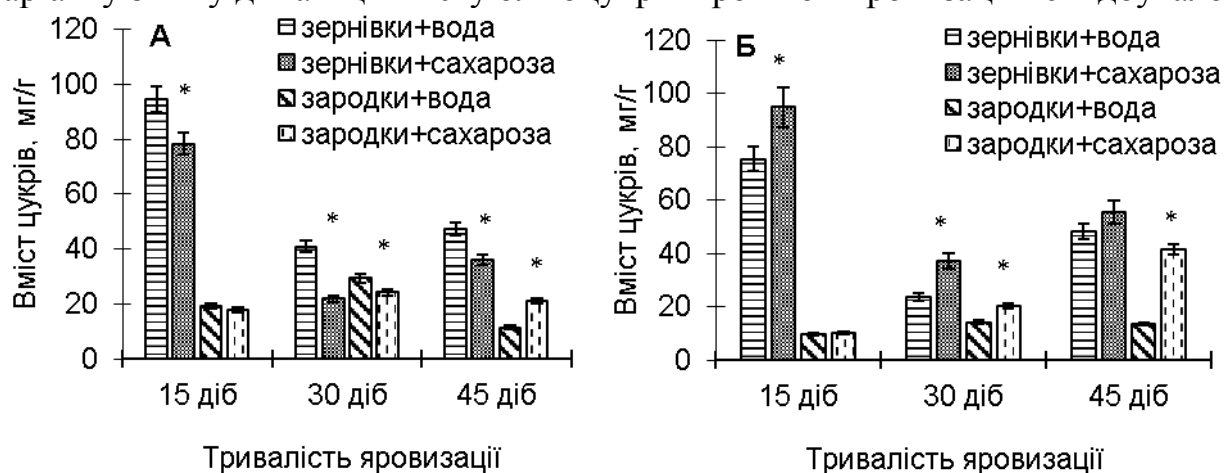


Рис. 4 Динаміка вмісту олігоцукрів протягом яровизації в проростках пшениці озимої двох сортів Дорідна (А) і Статна (Б) за різних умов трофічного забезпечення. Примітка. \* - різниця між варіантами статистично значуща при  $P \leq 0,05$

Таким чином, різний рівень трофічного забезпечення яровизації змінює динаміку вмісту вуглеводів, що може свідчити про зміни у вуглеводному обміні як основному факторі забезпечення цього процесу пластичним та енергетичним матеріалом і, можливо, експресії генів *Vrn* (Chumakova, Avksentieva, 2018).

**Вплив контрастних трофічних умов яровизації на ріст проростків та темпи розвитку рослин озимої м'якої пшениці.** Ріст – інтегральний показник перебігу процесів життєдіяльності рослинного організму. Вірогідно, що зміни у рості проростків за яровизації можуть відображувати характер її перебігу залежно трофічного забезпечення. Ми також припускали, що трофічне забезпечення процесу яровизації є одним з вагомих факторів, які визначають темпи розвитку яровизованих рослин і, можливо, експресію генів *Vrn*.

Досліди проведені з сортами озимої пшениці Дорідна, Статна і Досконала. У них установлені подібні загальні закономірності змін у ростових процесах і темпах розвитку залежно від трофічного забезпечення яровизації. Тому ми наводимо результати дослідів із сортом Досконала. Вони показали, що лінійний ріст коренів і надземної частини проростків протягом яровизації поступово посилювався за оптимального трофічного забезпечення (рис. 5).

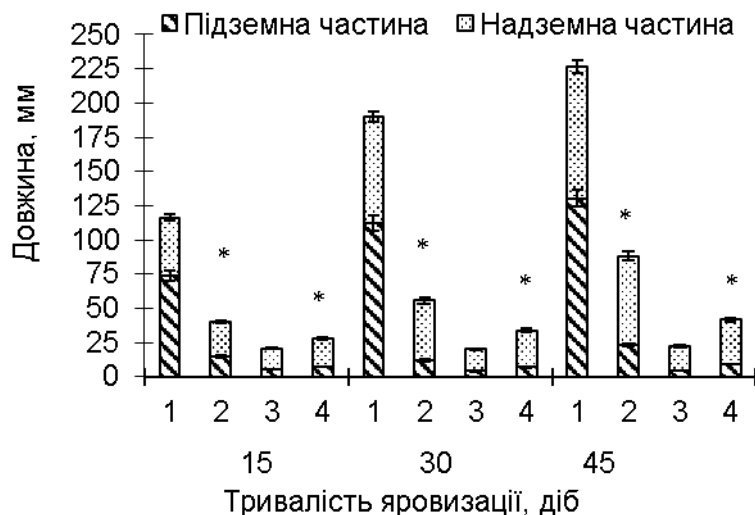


Рис. 5 Вплив контрастних умов трофічного забезпечення на динаміку росту проростків сорту Дорідна. 1 - зернівки + вода; 2 - зернівки + сахароза; 3 - зародки + вода; 4 - зародки + сахароза. Примітка. \* - різниця між варіантами статистично значуща при  $P \leq 0,05$

За надмірного трофічного забезпечення інтенсивність росту була значно нижчою, ніж за оптимального, але за характером динаміки протягом яровизації була подібною до росту за оптимального трофічного забезпечення. Ріст проростків у варіанті зародки + сахароза подібний за динамікою до росту за оптимального трофічного забезпечення, але при значно нижчій інтенсивності. За відсутності трофічного забезпечення ріст відбувався дуже повільно і практично не змінювався протягом періоду яровизації (рис. 5).

Динаміка накопичення біомаси проростками (рис. 6) протягом яровизації при оптимальному, надмірному і недостатньому трофічному забезпеченні була подібною – накопичення біомаси підвищувалося, хоча й відрізнялося значно за інтенсивністю. За відсутності трофічного забезпечення накопичення біомаси проростками впродовж яровизації практично не відбувалося. Зазначимо, що лінійний ріст і накопичення біомаси пригнічувалися не тільки за недостатнього трофічного забезпечення та його відсутності, а й за надмірного.

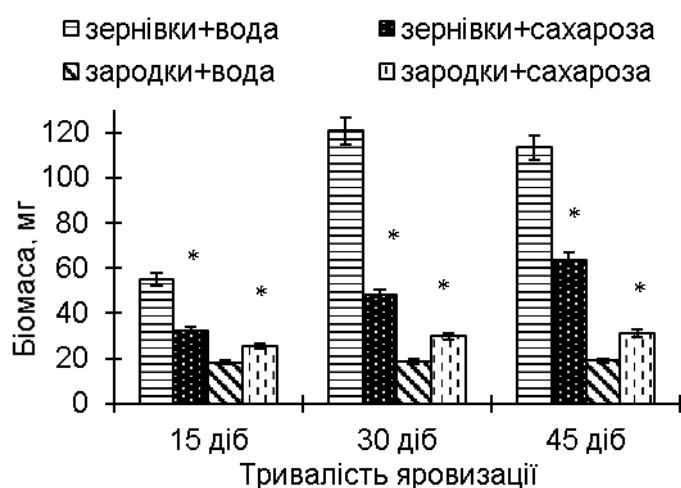


Рис. 6 Вплив контрастних умов трофічного забезпечення на динаміку накопичення біомаси проростків сорту Дорідна за яровизації.

Примітка. \* - різниця статистично значуща при  $P \leq 0,05$

Це дає підставу припустити, що рівень трофічного забезпечення яровизації є вагомим чинником нормального її перебігу.

У вегетаційному досліді вивчали темпи розвитку рослин сортів, вирощених з проростків, яровизованих за різного рівня трофічного забезпечення (Авксентьева, Шулік, 2017; Chumakova, Avksentieva, 2018). Результати показали (табл. 2), що за оптимального (зернівки + вода) і недостатнього трофічного забезпечення (зародки + сахароза) рослини значно прискорювали проходження фаз розвитку, раніше переходили до колосіння і дозрівання, ніж за його відсутності.

Таблиця 2

**Тривалість фенологічних фаз у рослин сорту Дорідна, вирощених з проростків, яровизованих за різного трофічного забезпечення (вегетаційний дослід)**

Варіант досліді	Діб від висаджування до початку фенофази			
	Кущіння	Вихід у трубку	Колосіння	Дозрівання
Зернівки + вода	23 ± 1	60 ± 2	80 ± 3	92 ± 3
Зародки + вода	35 ± 1	70 ± 2	100 ± 3	112 ± 3
Зародки + сахароза	29 ± 1	65 ± 2	88 ± 3	98 ± 3

Отже, трофічне забезпечення яровизації є необхідною і достатньою умовою, яка визначає темпи розвитку рослин пшениці озимої.

### Фітогормональна регуляція яровизаційного процесу

**Ріст проростків за впливу гіберелінів в період яровизації.** ГК – один з фітогормонів, який грає вагомую роль у регуляції яровизаційних процесів і, навіть, здатен обумовлювати перехід до генеративного стану без яровизації окремих озимих злаків і дворічних рослин (Pearce, 2013). Результати визначення лінійного росту проростків досліджених сортів показали, що екзогенний ГК (10 мг/л) значно стимулював лінійний ріст надземної частини як проростків, одержаних з цілих зернівок, так і проростків, одержаних з ізольованих зародків, порівняно до відповідних контрольних варіантів – зернівки + вода (1) та зародки + вода (3) (рис. 7). Ріст підземної частини за дії ГК практично не змінювався.



Рис. 7 Вплив гібереліну на лінійний ріст проростків озимої пшениці за яровизації. Варіанти дослідів: 1 - зернівки + вода; 2 - зернівки + ГК; 3 - зародки + вода; 4 - зародки + ГК. Примітка. \* - різниця з контролем (1 і 3) статистично значуща при  $P \leq 0,05$

Накопичення біомаси проростками за дії ГК значно стимулювалося як за оптимального, так і за відсутності трофічного забезпечення яровизації у всіх досліджуваних сортів пшениці (рис. 8).

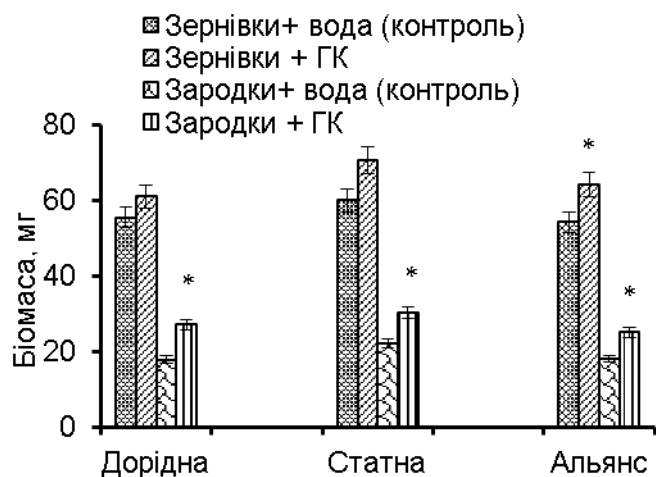


Рис. 8 Вплив гібереліну на біосинтез маси проростків пшениці озимої за різного трофічного забезпечення яровизації. Примітка. \* - різниця з контролем статистично значуща при  $P \leq 0,05$

Факт стимуляції накопичення біомаси проростками у варіанті зародки + ГК можна пояснити зростанням процесів реутилізації, можливо, навіть залучення структурних вуглеводів на ріст за нестачі трофічного забезпечення.

Оскільки ефекти ГК на ростові процеси зі значно більшою інтенсивністю проявляються у всіх сортів за оптимального трофічного забезпечення, ніж за його нестачі, то це, вірогідно, свідчить про зв'язок регуляції росту цим гормоном

з трофічними факторами за яровизації пшениці озимої (Чумакова, Авксентьєва, 2018).

**Вміст вуглеводів за впливу гіберелінів в період яровизації.** Вуглеводний обмін може бути пов'язаний з ефектами ГК, оскільки цей фітогормон здатен взаємодіяти з вуглеводами на рівні сигналіngu у процесах експресії генів (Firuzeh et al, 2015), можливо і експресії генів *Vrn*.

Вплив праймування ГК на фоні контрастних умов трофічного забезпечення на вміст моно- і олігоцукрів визначали на 45-ту добу яровизації. Установлено, що ГК стимулював накопичення як моно-, так і олігоцукрів на фоні нестачі трофічного забезпечення (зародки + вода) у всіх сортів (рис. 9 А). На фоні оптимального трофічного забезпечення ГК практично не змінював накопичення моноцукрів в усіх сортів (рис. 9 А), а накопичення олігоцукрів пригнічував у сортів Статна і Альянс, але стимулював його у сорту Дорідна (рис. 9 Б).

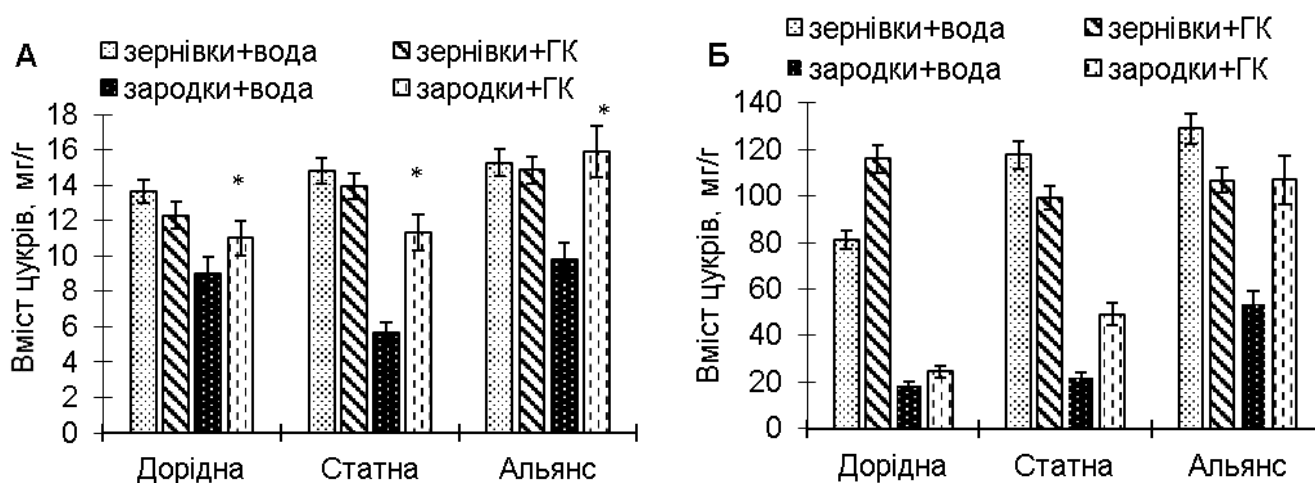


Рис. 9 Вплив ГК та контрастних умов трофічного забезпечення на вміст моноцукрів (А) і олігоцукрів (Б) в проростках сортів пшениці за яровизації. Примітка. \* - різниця з контролем статистично значуща при  $P \leq 0,05$

Одержані результати дозволяють припустити, що дія ГК у процесі яровизації може бути пов'язана з обміном вуглеводів залежно від трофічного забезпечення цього процесу (Чумакова, Авксентьєва, 2018).

**Темпи розвитку рослин сортів пшениці, вирощених з проростків, яровизованих за праймування ГК.** Враховуючи дані літератури про ефекти ГК на яровизацію, ми припускали, що критерієм взаємодії фітогормону та трофічних факторів у яровизації можуть бути темпи розвитку рослин пшениці озимої, вирощені з яровизованих проростків при різному трофічному забезпечення за праймування ГК.

Із зародків, які яровизували на воді, а також на воді за праймування ГК не вдалося одержати повноцінних рослин у вегетаційному досліді. З цієї причини наводимо дані, одержані у варіантах зернівки + вода (контроль) та за дії ГК (зернівки + ГК). Результати показали (табл. 3), що тривалість періоду до фази кушіння у всіх сортів за дії ГК не змінювалася.



Тривалість періоду до фази виходу у трубку та до колосіння у сортів Статна та Альянс була значно коротшою за дії ГК, а у сорту Дорідна довшою, порівняно до контролю (табл. 3). Вірогідно, що регуляція темпів розвитку пшениці озимої за участі ГК здійснюється у зв'язку з рівнем трофічного забезпечення яровизаційного процесу. Той факт, що ГК на фоні оптимального трофічного забезпечення зумовив уповільнення розвитку сорту Дорідна, вірогідно, можна пояснити генотиповою особливістю сорту відносно чутливості до дії ГК (Чумакова, Авксентьева, 2018).

Таблиця 3

**Темпи розвитку рослин сортів пшениці озимої, вирощених з проростків, яровизованих за дії ГК на фоні різного трофічного забезпечення**

Варіант досліджу	Діб від висаджування до початку фенофази		
	Кущіння	Вихід у трубку	Колосіння
Сорт Дорідна			
Зернівки + вода (контроль)	25 ± 1	64 ± 2	80 ± 3
Зернівки + ГК	24 ± 1	70 ± 2	88 ± 3
Сорт Статна			
Зернівки + вода (контроль)	19 ± 1	40 ± 1	64 ± 2
Зернівки + ГК	18 ± 1	35 ± 1	53 ± 2
Сорт Альянс			
Зернівки + вода (контроль)	28 ± 1	85 ± 2	100 ± 3
Зернівки + ГК	26 ± 1	72 ± 2	90 ± 3

**Дослідження яровизаційного процесу у культурі *in vitro***

**Вплив пониженої температури на морфогенетичні реакції калусної культури сортів озимої пшениці.** Досліди проведені з пересадковою культурою сортів пшениці Дорідна, Статна і Астет за схемою: культивування калусів при 26 °C (контроль) (рис. 10 б) і культивування при +4 ± 1 °C (яровизація) (рис. 10 в). Морфогенетичні процеси аналізували після 15, 30 і 45-ти діб яровизації. Загальний вигляд пересадкової калусної культури представлено на рисунку 10 а.

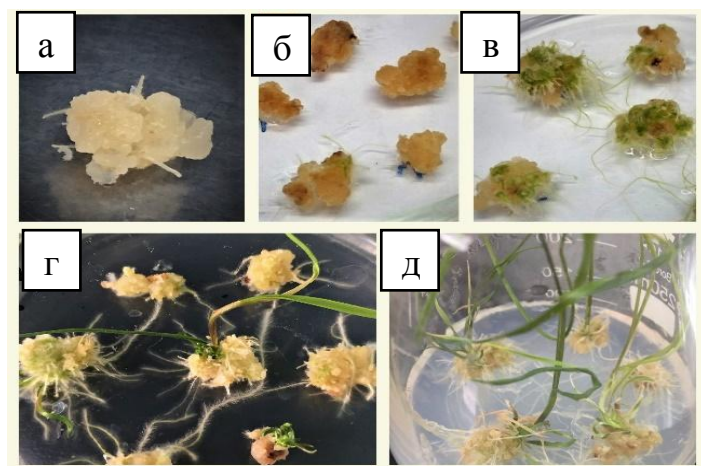


Рис. 10 Калусна культура озимої м'якої пшениці сорту Статна: а – загальний вигляд пересадкової калусної культури; б – контрольний варіант після 45 діб за 26 °C; в – дослідний варіант після 45 діб за 4 °C. Калусна культура сорту Альянс: г – геморизогенез на РС + ГК 0,5 мг/л; д – рослини-регенеранти

Після 15-ти діб яровизації підвищувався рівень хлорофіло- і гемогенезу та зростала кількість меристематичних осередків у калусах, але ризогенез практично



не змінювалася, порівняно до контролю (Shulik, 2018; Chumakova, Avksentyeva, 2020). Калусна культура з морфогенними структурами дослідного і контрольного варіантів озимої пшениці представлена на рисунку 10 б, в. Зелені ділянки з тонкими нитчастими структурами, що мають чітко виражені межі, та з яких у подальшому розвивалися листя та корені – процес геморизогенезу.

Після 30-ти діб яровизації проявлялися ті ж ефекти, що і після 15 діб. Тільки у сорту Дорідна рівень хлорофілогенезу за яровизації був таким же, як і в контрольному варіанті. На завершення яровизації (45-ту добу) всі показники морфогенетичних реакцій у калусній культурі всіх сортів були значно вищими, ніж у контролі (табл. 4).

Таблиця 4

**Вплив 45-добової холодової експозиції на морфогенез калусної культури сортів озимої пшениці, %**

Сорт	Варіант, t °C	Хлорофілогенез	Гемогенез	Ризогенез
Дорідна	26 °C	30,8 ± 1,5	0,0	84,6 ± 4,20
	4 °C	94,5 ± 4,7*	35,0 ± 1,7*	100,0 ± 5,0*
Статна	26 °C	20,0 ± 1,0	0,0	60,0 ± 3,0
	4 °C	69,5 ± 3,4*	30,0 ± 1,5*	100,0 ± 5,0*
Астет	26 °C	37,5 ± 1,9	0,0	80,0 ± 3,9
	4 °C	71,4 ± 3,6*	12,5 ± 0,6*	100,0 ± 5,0*

*Примітка.* \* - різниця з контролем статистично значуща при  $P \leq 0,05$

Зазначимо, що при загальній закономірності прояву ефекту яровизації на морфогенез калусів сорти відрізнялися за рівнем показників цього процесу. Це може означати, що генотип сорту значно впливає на прояв морфогенетичних реакцій *in vitro* (Shulik, 2018; Chumakova, Avksentyeva, 2020).

Таким чином, посилення морфогенетичних реакцій *in vitro* у озимої пшениці за дії пониженої температури може свідчити про те, що в цих умовах проявляються ефекти генів потреби у яровизації (*Vrn*) на ці процеси. Отже, цілком вірогідно, що культура *in vitro* є адекватною і надійною моделлю для дослідження закономірностей морфогенезу пшениці озимої.

**Вплив фітогормонального складу регенераційного середовища на ефективність морфогенезу калусної культури сортів озимої пшениці.** Відомо, що фітогормони у складі живильного середовища *in vitro* необхідні чинники морфогенезу. Однак, ефекти ГК на цей процес у калусній культурі пшениці озимої досліджені недостатньо, хоча їх вивчення вагоме для поглиблення уявлень щодо ролі фітогормонального статусу культури *in vitro*. Ми у якості рослинного матеріалу використали сорт Альянс. Калуси культивували на регенераційному середовищі протягом чотирьох тижнів і визначали ефективність гемо- та ризогенезу (табл. 5).

Результати показали, що максимальна ефективність гемогенезу була за дії ГК з концентрацією 0,5 мг/л, порівняно до показників у контролі та у інших варіантах (табл. 5). При цьому, на деяких калусах варіанту РС + ГК 0,5 мг/л спостерігалася

утворення листя і колеоптилів (рис. 10 г). А при подальшому культивуванні отримали рослини-регенеранти пшениці сорту Альянс (рис. 10 д).

Таблиця 5

**Вплив ГК на ефективність гемогенезу пересадкової калусної культури пшениці озимої сорту Альянс, %**

Варіант	Гемогенез після культивування, тижнів			
	Один	Два	Три	Чотири
РС (МС + 3 мг/л БАП + 5мг/л НОК) Контроль	23,3 ± 0,7	26,6 ± 1,7	26,6 ± 1,7	26,6 ± 1,7
РС + ГК 0,1 мг/л	20,0 ± 0,5	23,3 ± 0,7	23,3 ± 0,7	26,6 ± 1,7
РС + ГК 0,5 мг/л	26,6 ± 1,7	30,0 ± 1,1	30,0 ± 1,1	30,0 ± 1,1
РС + ГК 1,0 мг/л	20,0 ± 0,5	20,0 ± 0,5	20,0 ± 0,5	23,3 ± 0,7
РС + ГК 10 мг/л	20,0 ± 0,5	20,0 ± 0,5	20,0 ± 0,5	23,3 ± 0,7

Результати показали також, що у калусах відбувався хлорофілогенез уже протягом першого тижня інкубації. Найвищий його показник був у контролі та варіантах РС + ГК 0,1 мг/л і РС + ГК 0,5 мг/л, дещо менший у РС + ГК 1,0 мг/л, а найнижчий у варіанті РС + ГК 1,0 мг/л. Отже, ГК з концентрацією 10 мг/л у складі регенераційного середовища інгібує хлорофілогенез. Щодо ризогенезу, то в усіх варіантах дослідів він відбувався достатньо інтенсивно і різниці між варіантами за цим показником не виявлено.

Таким чином, ефекти ГК на морфогенез в культурі *in vitro* пшениці м'якої сорту Альянс залежали від концентрації фітогормону. Гіберелін у складі живильного середовища, поряд з іншими фітогормонами, є вагомим чинником регуляції морфогенетичних процесів у культурі *in vitro* пшениці озимої (Чумакова, 2020).

## УЗАГАЛЬНЕННЯ

Спираючись на літературні та власні дані, можна зробити наступне узагальнення щодо закономірностей генетичного контролю, гормональної та трофічної регуляції яровизаційних процесів пшениці озимої м'якої, а також ефектів генів потреби у яровизації у культурі *in vitro*.

Нами показано, що алельний стан генів *Vrn* у ізогенних ліній *Vrn-1*, *Vrn-2* і *Vrn-3* відрізняється і це зумовлює різні темпи їх розвитку у вегетаційних та польових дослідів, що співпадає з літературними даними (Стельмах, 2000, Sosra et al., 2007). Нами вперше показано, що яровизація проростків за різного трофічного забезпечення зумовлює зміну у алельному стані гена *Vrn-B1*, головного репресора переходу до цвітіння пшениці озимої (Distelfeld et al., 2009). З'ясовано, що різний рівень трофічного забезпечення за яровизації зумовлював зміни у обміні вуглеводів та темпах розвитку рослин, вирощених з яровизованих за цих умов проростків. Отже, генетична регуляція яровизаційних процесів залежить від їх трофічного забезпечення.

Відомо, що одним із шляхів регуляції яровизаційних процесів є гібереліновий (Davis, 2009; Pearce et al., 2013). Нами вперше показано, що праймування ГК за яровизації на фоні різного рівня трофічного забезпечення зумовлює зміни у обміні вуглеводів, ростових процесах і темпах розвитку рослин. Це є свідченням зв'язку гіберелінового шляху яровизації з трофічними процесами.

Умовою коректних досліджень генетичного контролю морфогенезу у культурі *in vitro* є стабільність геному (Бавол и др., 2008). Нами показаний практично ідентичний алельний стан генів *Vrn* культурі *in vitro* та у *in vivo*. Встановлено також, що інтенсивність морфогенезу у культурі *in vitro* залежала від генотипу ліній за генами *Vrn*. З'ясовано, що протягом періоду яровизації калусної культури *in vitro* посилювалися морфогенетичні процеси у сортів пшениці озимої. Отже, система генів *Vrn* зберігає стабільність у культурі *in vitro*, а морфогенез підлягає контролю цими генами.

Фітогормональний комплекс у живильному середовищі визначає перебіг морфогенезу у культурі *in vitro*. Він складається з гормонів цитокінінової та ауксинової природи, але, як правило, не містить гіберелінів. Відомо, що ці фітогормони проявляють істотні регуляторні ефекти, зокрема визначають специфічний тип росту злаків, однак вони практично не досліджені у культурі *in vitro* пшениці. Нами вперше показано, що ГК у складі живильного середовища здатен стимулювати морфогенез у культурі калусів пшениці озимої м'якої, доповнюючи ефекти інших фітогормонів.

Таким чином, фітогормональні і трофічні фактори у взаємозв'язку між собою та генетичними факторами відіграють істотну роль у регуляції яровизаційних процесів, а відтак і темпів розвитку пшениці озимої м'якої.

## ВИСНОВКИ

Вперше проведено комплексне дослідження взаємозв'язку генетичних, трофічних та фітогормональних факторів регуляції яровизаційного процесу за умов *in vivo* та *in vitro*. Показано, що трофічні умови яровизації та праймування гібереліном визначають інтенсивність мітотичної активності, хід ростової реакції проростків, динаміку накопичення розчинних цукрів та темпи розвитку рослин озимої пшениці.

1. З'ясовано, що ізогенні за генами *Vrn* лінії пшениці м'якої відрізняються за алельним станом цих генів, що обумовлює різні темпи їх розвитку.
2. Показано, що оптимальні умови трофічного забезпечення яровизації (нативні та штучні) по його завершенні призводять до змін у алельному стані локусу гену *Vrn-B1*- головного репресора цвітіння *Triticum aestivum* L.
3. Встановлено, що 3 %-ний розчин сахарози стимулює мітотичну активність корневих меристем у проростків, яровизованих без ендосперму, порівняно до активності у проростках, яровизованих з ендоспермом та з ендоспермом на 3 %-ній сахарозі. Це свідчить про залежність проліферації клітин від рівня трофічного забезпечення.

4. Виявлено, що контрастні умови трофічного забезпечення яровизаційного процесу обумовлюють динаміку змін лінійного росту, накопичення біомаси та вмісту розчинних вуглеводів в яровизованих проростках досліджуваних сортів.
5. Показано, що праймування ГК<sub>3</sub> в період яровизації стимулює ростові процеси та біосинтез розчинних вуглеводів за рахунок фракції олігоцукрів у проростків досліджуваних сортів. Інтенсивність цих процесів залежить від рівня трофічного забезпечення яровизації.
6. Встановлено, що пролонгована дія оптимальних умов трофічного фактору та праймування фітогормоном ГК<sub>3</sub> на темпи розвитку рослин озимої м'якої пшениці проявляється у прискоренні переходу до колосіння, що є фенотиповим доказом позитивного впливу досліджуваних факторів на експресію генів *Vrn*.
7. З'ясовано, що в пересадковій калусній культурі *in vitro* 2-3 пасажу ізогенних за генами *Vrn* ліній зберігається алельний стан локусів генів потреби у яровизації, подібно тому, який характерний для *in vivo*. Це свідчить про стабільність системи генів *Vrn* озимої пшениці за умов культивування *in vitro*.
8. Показано, що низькотемпературний вплив на калусну культуру та додавання в живильне середовище МС гіберелінів у концентрації 0,5 мг/л значно стимулює морфогенетичні реакції калусів та ефективність процесу отримання рослин-регенерантів за умов культури *in vitro*.
9. Фітогормональна та трофічна регуляція яровизаційних процесів є необхідною умовою забезпечення нормального перебігу яровизації та експресії генів *Vrn*, що визначає темпи розвитку пшениці озимої м'якої.

## СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

### Публікації у фахових виданнях України:

1. Авксентьева О. А., **Шулик В. В.**, Жмурко В. В. Аллельные варианты генов *VRN* и темпы развития изогенных линий мягкой пшеницы. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2015. Т. 17. С. 17–21. (Здобувач брала участь в експериментальній частині роботи та аналізі результатів досліджень).
2. Авксентьева О. О., **Шулик В. В.** Дослідження впливу контрастних умов трофічного забезпечення за яровизації на мітотичну активність меристем, ріст та розвиток озимої пшениці. *ScienceRise: Biological Science*. 2017. № 2 (5). С. 4–9. (Здобувач брала участь в експериментальній частині роботи, аналізі та обговоренні результатів досліджень).
3. Авксентьева О. А., Зубрич А. И., Васильченко М. С., **Шулик В. В.** Эффекты генов контроля темпов развития растений в формировании индивидуальной продуктивности пшеницы и сои. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2018. № 23. С. 261–267. (Здобувач брала участь в експериментальній частині роботи, аналізі та обговоренні результатів досліджень).
4. **Чумакова В. В.**, Авксентьева О. О. Вплив праймування гібереліном за яровизації на ріст та вміст розчинних вуглеводів в проростках пшениці м'якої. *Біологічні системи: теорія та інновації*. 2018. № 287. С. 173–183. (Здобувач брала

участь в експериментальній частині роботи, аналізі та обговоренні результатів досліджень).

5. **Chumakova V. V.**, Avksentieva O. A. Effect of trophic support on the dynamics of growth processes and carbohydrate content of winter wheat sprouts under vernalization. *The Journal of V. N. Karazin Kharkiv National University. Series "Biology"*. 2018. Vol. 31. P. 138–147. (Здобувач брала участь в експериментальній частині роботи, аналізі та обговоренні результатів досліджень).

**Публікація у фаховому виданні України, що входить до міжнародної наукометричної бази:**

6. Авксентьєва О. О., **Шулік В. В.** Алельний стан і ефекти генів *VRN* пшениці м'якої у системі *in vivo* та *in vitro*. *Biosystems Diversity*. 2016. Vol. 24, No 1. С. 222–229. (Здобувач брала участь в експериментальній частині роботи, аналізі та обговоренні результатів досліджень) (Web of Science).

**Наукова праця, в якій опубліковані основні наукові результати дисертації у зарубіжному спеціалізованому виданні:**

7. Avksentieva O. O., **Shulik V. V.**, Taran N. Yu. Research into the influence of contrasting trophic conditions of vernalization on the allelic state of *Vrn* genes and the development rates of *Triticum aestivum* L. *Biologija*. 2018. Vol. 64. No. 1. P. 73–81. (Здобувач брала участь в експериментальній частині роботи, аналізі та обговоренні результатів досліджень).

**Наукова праця, яка додатково відображає наукові результати дисертації:**

8. Жмурко В. В., Авксентьєва О. О., Юхно Ю. Ю., Попова Ю. В., Самойлов А. М., Тимошенко В. Ф., Васильченко М. С., **Шулік В. В.**, Зубрич О. І. Ефекти генів фотоперіодичної чутливості і потреби в яровизації на фізіолого-біохімічні процеси у рослин пшениці м'якої та сої культурної. *Фізіологія рослин: досягнення та нові напрямки розвитку*. 2017. С. 187–196. (Здобувач брала участь в експериментальній частині роботи та статистичній обробці результатів досліджень).

**Наукові праці апробаційного характеру за темою дисертації:**

9. **Шулік В. В.**, Авксентьєва О. О. Молекулярно-біологічне дослідження алельного стану генів контролю темпів розвитку *Triticum aestivum* L. // Молодь і поступ біології : матеріали XI Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів, 20–23 квітня 2015 р., Львів, 2015. С. 532. (Здобувач брала участь в експериментальній частині роботи, аналізі та обговоренні результатів досліджень).

10. **Шулік В. В.** Аллельное состояние локусов генов системы *Vrn* пшеницы мягкой в условиях *in vivo* и *in vitro* // Матеріали III Міжнародного форуму студентів, аспірантів і молодих учених, 23–24 квітня 2015 р., Дніпропетровськ, 2015. С. 468.

11. Авксентьева О. А., **Шулик В. В.** Изучение аллельных вариантов локусов генов *VRN* пшеницы мягкой в течение яровизации и в связи с темпами развития // Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействиях : материалы VIII съезда общества физиологов растений России, 21–26 сентября 2015 г., Петрозаводск, Россия, 2015. С. 24. *(Здобувач брала участь в експериментальній частині роботи та аналізі результатів досліджень).*
12. **Shulik V. V.**, Koskova V. A. Trophic factors effect on the proliferative activity of apical meristem of winter wheat two varieties under vernalization // Фундаментальні та прикладні дослідження в біології та екології : матеріали IV Міжнародної наукової конференції студентів, аспірантів і молодих вчених, 12–14 квітня 2016 р., Вінниця, 2016. С. 316–317. *(Здобувач брала участь в експериментальній частині роботи, аналізі та обговоренні результатів досліджень).*
13. **Шулік В. В.**, Кириленко А. С., Коскова В. А. Вплив трофічного фактору на алельний стан гену *VRN-A1* та морфометричні показники проростків озимої пшениці за яровизації // Біологічні дослідження – 2016 : матеріали VII Всеукраїнської науково-практичної конференції для молодих учених і студентів, 10–11 березня 2016 р., Житомир, 2016. С. 142–143. *(Здобувач брала участь в експериментальній частині роботи, аналізі та обговоренні результатів досліджень).*
14. **Шулік В. В.** Біоінформаційне дослідження системи генів яровизаційного контролю у представників родини *Poaceae* // Біологія: від молекули до біосфери : матеріали X Міжнародної конференції молодих учених, 2–4 грудня 2015 р., Харків, 2015. С. 31.
15. Авксентьева О. О., **Шулік В. В.** Молекулярно-генетичні дослідження системи генів *VRN in vivo* та *in vitro* // Сучасні напрями селекційного удосконалення пшениці : матеріали міжнародної конференції, присвяченої 100-річчю селекції пшениці в Селекційно-генетичному інституті – Національному центрі насіннізнавства та сортовивчення, 1–3 червня 2016 р., Одеса, 2016. С. 67–68. *(Здобувач брала участь в експериментальній частині роботи та аналізі результатів досліджень).*
16. Авксентьева О. А., Васильченко М. С., **Шулик В. В.** Роль генетических систем контроля темпов развития растений в детерминации каллусогенеза изолиний NILs пшеницы и сои // Сигнальные системы растений: от рецептора до ответной реакции организма : материалы годовичного собрания Общества физиологов растений России, 21–24 июня 2016 г., Санкт-Петербург, 2016. С. 87–88. *(Здобувач брала участь в експериментальній частині роботи та аналізі результатів досліджень).*
17. **Шулік В. В.** Вплив трофічного фактору за умов яровизації на вміст редукуючих цукрів у проростках озимої пшениці // Біологія: від молекули до біосфери : матеріали XI Міжнародної конференції молодих учених, 29 листопада–2 грудня, 2016 р., Харків, 2016. С. 107–108.
18. Авксентьева О. О., **Шулік В. В.** Популяризація знань з біології рослин в роботі викладачів кафедри фізіології і біохімії рослин та мікроорганізмів Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна // Фізіологія рослин у системі сучасних біологічних знань та наук : матеріали II науково-методичного

інтернет-семінару, 14 грудня 2016 р., Харків, 2017. С. 54–56. (Здобувач брала участь в експериментальній частині роботи, аналізі та обговоренні результатів досліджень).

19. **Шулік В. В.**, Самойлов А. М. Молекулярно-біологічні методи дослідження фізіологічних процесів рослин та мікроорганізмів як складова підготовки магістрів на кафедрі фізіології і біохімії рослин та мікроорганізмів ХНУ імені В. Н. Каразіна // Фізіологія рослин у системі сучасних біологічних знань та наук : матеріали II науково-методичного інтернет-семінару, 14 грудня 2016 р., Харків, 2016. С. 63–65. (Здобувач брала участь в експериментальній частині роботи, аналізі та обговоренні результатів досліджень).

20. **Шулік В. В.** Дослідження впливу різних умов трофічного забезпечення на фізіолого-біохімічні процеси та алельний стан гену *Vrn-A1* в проростках озимої пшениці упродовж яровизації // Біологія рослин і біотехнологія : III конференція молодих учених, 16–18 травня 2017 р. : тези доп. Київ, 2017. С. 31.

21. Avksentiieva O. A., **Shulik V. V.**, Taran N. Yu. Research of Influence of Contrasting Trophic Conditions of Vernalization on the Allelic State of *VRN* Genes and the Development Rates of *Triticum aestivum* L. // SmartBio : International Conference, 18–20 May 2017 : abstr., Kaunas, 2017. P. 23. (Здобувач брала участь в експериментальній частині роботи, аналізі та обговоренні результатів досліджень).

22. **Шулік В. В.** Дослідження впливу сахарози та гіберелінів на вміст розчинних вуглеводів в яровизованих проростках озимої пшениці // Біотехнологія: звершення та надії : VI Міжнародна науково-практична конференція, присвячена до 120-річчя НУБіП України, 14–16 листопада 2017 р. : тези доп. Київ, 2017. С. 320–321.

23. Терентьєва Н. В., Степченкова С. В., **Шулік В. В.**, Авксентьєва О. О. Вплив ліофілізованого препарату молозива корів на ростову реакцію та морфо-фізіологічні особливості калусної культури // Біотехнологія: звершення та надії : VI Міжнародна науково-практична конференція, присвячена до 120-річчя НУБіП України, 14–16 листопада 2017 р. : тези доп. Київ, 2017. С. 86–88. (Здобувач брала участь в експериментальній частині роботи, аналізі та обговоренні результатів досліджень).

24. Avksentiieva O. O., **Shulik V. V.**, Terentiiieva N. V. Culture *in vitro* - model system for the study of morphogenetic and adaptative potential of soft wheat *Triticum aestivum* L. // Modern methodologies, innovations, and operational experience in the field of biological sciences : International research and practice conference, 27–28 December 2017, Lublin, 2017. С. 263–267. (Здобувач брала участь в експериментальній частині роботи, статистичній обробці та обговоренні результатів досліджень).

25. **Shulik V. V.** Effect of low-temperature exposure on the morphogenesis reactions of the callus culture of winter wheat // Клеточная биология и биотехнология растений : Междунар. науч.-практ. конф., 28–31 мая 2018 г. : тез. докл. Минск, 2018. С. 56–57.

26. **Chumakova V. V.** The role of *Vrn* genes system, phytohormonal and trophic regulation of vernalization process of winter wheat *in vivo* and *in vitro* // Сучасна

біологія рослин: теоретичні та прикладні аспекти : IV Міжнародна наукова конференція, 9–10 жовтня 2018 р. : тези доп. Харків, 2018. С. 27–28.

27. **Чумакова В. В.** Вплив фітогормонального складу регенераційного середовища на ефективність морфогенезу калусної культури озимої м'якої пшениці // Сучасна біологія рослин: теоретичні та прикладні аспекти : V Міжнародна наукова конференція, 12–13 лютого 2020 р. : тези доп. Харків, 2020. С. 89–90.

28. **Chumakova V., Avksentyeva O.** Morphogenetic Responses of Winter Wheat Callus Culture Under Prolonged Period of Low-Temperature Exposure // Problems of Cryobiology and Cryomedicine. 2020. № 30 (3), 287. (Здобувач брала участь в експериментальній частині роботи, аналізі та обговоренні результатів досліджень).

## АНОТАЦІЯ

**Чумакова В. В.** Фітогормональна та трофічна регуляція яровизаційного процесу озимої м'якої пшениці *in vivo* та *in vitro*. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.12 – фізіологія рослин. – Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна Міністерства освіти і науки України. – Харків, 2021.

Робота присвячена з'ясуванню алельного стану генів *Vrn*, закономірностей перебігу яровизаційних процесів у проростках пшениці м'якої озимої на фоні різного трофічного забезпечення, а також за праймування гібереліном. Досліджені алельний стан генів *Vrn* у культурі *in vitro*, їх ефекти на морфогенез за яровизації та вплив ГК на морфогенетичні процеси у калусах.

У алельному стані генів *VRN* у ізогенних ліній пшениці виявлені відмінності, які обумовлювали різні темпи розвитку рослин.

Природне і штучне трофічне забезпечення проростків на 45-ту добу яровизації зумовлювало зміну алельного стану гену *Vrn-B1b*. Різний рівень трофічного забезпечення яровизації і ГК на його фоні визначав інтенсивність ростових процесів, проліферації клітин, обміну вуглеводів та темпи розвитку рослин.

У культурі *in vitro* алельний стан генів *Vrn* не змінювався. Протягом 45-ти діб яровизації в калусній культурі пшениці посилювалися морфогенетичні процеси. Додавання ГК у живильне регенераційне середовище для культивування калусів *in vitro* викликало зміни у інтенсивності морфогенетичних процесів.

**Ключові слова:** пшениця м'яка (*Triticum aestivum* L.), ізогенні лінії, гени *Vrn*, гіберелін, яровизація, трофічне забезпечення, культура *in vitro*, темпи розвитку.



## ABSTRACT

***Chumakova V. V. Phytohormonal and trophic regulation of the vernalization process of winter wheat *in vivo* and *in vitro*. - Manuscript.***

Thesis for a Candidate Degree in Biology, Speciality 03.00.12 – Plant physiology. – V.N. Karazin Kharkiv National University of the Ministry of Education and Science of Ukraine. – Kharkiv, 2021.

The dissertation is devoted to find out the allelic state of *Vrn* genes, the patterns of vernalization processes in soft winter wheat sprouts under contrasting conditions of trophic support, as well as the priming of gibberellin (GA) under these conditions. The allelic state of *Vrn* genes *in vitro*, their effects on morphogenesis during vernalization and the influence of GA on morphogenetic processes in callus of winter wheat varieties have been studied.

The winter soft wheat varieties were used. There were Statna, Doridna, Alians, Astet, Myronivska 808 and Olvia, and the near-isogenic lines by *Vrn* genes (NILs), created in the genotype of winter varieties Myronivska 808 and Olvia. Depending on the tasks of the study, seeds, sprouts and callus culture were used.

The differences in the allelic state of *Vrn* genes were found that caused different rates of plant development of wheat isogenic lines. The presence of dominant alleles of *Vrn-A1* and recessive *vrn-B1* and *vrn-D1* genes was detected in the fast-growing isogenic lines and the presence of recessive *vrn-A1* and *vrn-D1* and the dominant *Vrn-B1* – in the slow-growing lines.

The natural and artificial trophic support of sprouts at the end of the vernalization period caused a change in the allelic state of the *Vrn-B1b* locus, the main repressor of winter wheat development.

Contrasting conditions of trophic support of the vernalization process and GA priming determined the intensity of growth processes, cell proliferation, carbohydrate metabolism and rates of plant development. On the 45th day of vernalization, under conditions of natural and artificial trophic support the highest mitotic index was detected. The excess of trophic support, as well as its deficit, inhibited the process of cell proliferation.

It was found that contrasting conditions of trophic support of vernalization have affected the dynamics of carbohydrate content. Under excess of trophic support, the carbohydrate content gradually decreased during vernalization in both varieties. Under deficit of trophic support, the dynamics of the content of monosaccharides of wheat plants did not changed. The GA stimulated the accumulation of both monosaccharides and oligosaccharides under the deficit of trophic support in all varieties.

Trophic support determined the dynamics of changes of linear growth and biomass accumulation. Deficit or excess of trophic support inhibited the growth response. The exogenous GA significantly stimulated the linear growth of the aboveground part and the accumulation of biomass of vernalized sprouts grown with and without endosperm.

It was shown that wheat plants with optimal and deficit of trophic support significantly accelerated the passing of development phases. Under the GA effect the

duration of the earing period in the varieties Statna and Alians was significantly shorter and in the variety Doridna longer.

*In vitro* research has shown that NILs are ranked according to the intensity of callusogenesis as follows: Vrn-2 > variety > Vrn-1 > Vrn-3. This may indicate the involvement of *Vrn* genes in the regulation of morphogenetic responses *in vitro* culture. The stability of the allelic state of *Vrn* genes in callus culture of winter wheat under *in vitro* cultivation has been shown. Thus, *in vitro* culture is a reliable and adequate model for studying the patterns of morphogenesis of soft wheat.

During 45 days of vernalization, morphogenetic processes was intensifying in the callus culture of winter wheat. These reactions significantly stimulated the process of obtaining regenerating plants. After 15 days of vernalization, the level of chlorophyll and hemogenesis and number of meristematic loci in calluses increased.

The addition of GA to the nutrient regenerating medium for cultivating of calluses *in vitro* caused changes in the intensity of morphogenetic processes depending on the phytohormone concentration. The maximum efficiency of hemogenesis was under the GA concentration of 0.5 mg/l. The formation of leaves and coleoptiles was observed in some calluses.

The complex research of the relationship between genetic, trophic and phytohormonal factors regulating the vernalization process *in vivo* and *in vitro* has been conducted. It is stated that phytohormones and trophic processes are necessary factors to provide the normal passing of vernalization processes, the expression of *Vrn* genes, which ultimately determines the rates of development of soft wheat.

**Key words:** soft wheat (*Triticum aestivum* L.), isogenic lines, *Vrn* genes, gibberellin, vernalization, trophic support, *in vitro* culture, rates of development.